この添付文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管しておいてください。

体外診断用医薬品

** 2015 年 8 月改訂(第 5 版)
* 2013 年 12 月改訂(第 4 版)

製造販売承認番号:22200AMX00995000

ヒト免疫不全症ウイルス1核酸キット

コバス TaqMan® HIV-1「オート」v2.0

【重要な基本的注意】
本キットのプライマーやプローブの反応領域(gag 及び LTR 遺伝子領域)に変異のあるウイルス株及び抗ウイルス薬の作用などにより反応領域が変異したウイルス株では、反応性が低下し、正確に測定できなくなることがあるので注意してください。

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて、担当医師が総合的に判断してください。
3. 添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。本キットは HIV-1 RNA の測定(定量キット)であり、ウイルス感染症の診断の補助に使用してください。よって、HIV-1 RNA の検出(定性)には使用しないでください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。また、試薬ごとに設定された反応時間及び温度などは厳守してください。
5. 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
6. TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v 2.0〔HIV-1 H(+)C, v 2.0〕、TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v 2.0〔HIV-1 L(+)C, v 2.0〕、コバス TaqMan (−)コントロール〔CTM(−)C〕には、ヒト血液由来成分が含まれており、HBs 抗原、抗 HIV-1/2 抗体及び HIV p24 抗原、抗 HCV 抗体、HIV-1 RNA、HCV RNA 、HBV DNA の陰性が確認されていますが、感染の危険性があるものとして取り扱ってください。
7. キットの試薬を取り扱う際には保護眼鏡、実験着及び使い捨てゴム手袋を着用し、試薬が皮膚、目、粘膜などに触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合は、大量の水でじゅうぶんに洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。

【形状・構造等(キットの構成)】

コバス TaqMan HIV-1「オート」v2.0

1. **TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット1**
   〔HIV-1 v2.0 CS1〕 48 テスト用 1カセット
   TaqMan 磁性粒子懸濁液〔MGP〕 1×7.0 mL
   93% イソプロピルアルコール
2. **TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット2**
   〔HIV-1 v2.0 CS2〕 48 テスト用 1カセット
   TaqMan 溶解試液〔LYS〕 1×78 mL
3. **TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット3**
   〔HIV-1 v2.0 CS3〕 48 テスト用 1カセット
   (1) TaqMan プロテアーゼ試液〔Pase〕 1×3.8 mL
   (2) TaqMan 溶出試液〔EB〕 1×7.0 mL
4. **TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット4**
   〔HIV-1 v2.0 CS4〕 48 テスト用 1カセット
   (1) TaqMan HIV-1 QS〔HIV-1 QS〕 1×3.6 mL
   (2) TaqMan HIV-1 マスターミックス v2.0〔HIV-1 MMX〕 1×2.5 mL
   プライマー−WH43A
   プライマー−WH45A
   プライマー−WH50
   プライマー−KY963EtBu
   プライマー−KY993EtBu
   プライマー−KY996Bu
   プライマー−KY1006Bu
   2'−デオキシアデノシン−5'−三リン酸(dATP)
   2'−デオキシシチジン−5'−三リン酸(dCTP)
   2'−デオキシグアノシン−5'−三リン酸(dGTP)
   2'−デオキシウリジン−5'−三リン酸(dUTP)
   2'−デオキシチミジン−5'−三リン酸(dTTP)
   蛍光標識 HIV-1 用 DNA プローブ−GAG108P2S22
   蛍光標識 HIV-1 用 DNA プローブ−KY844CY5FAM
   Z05 DNA ポリメラーゼ
   ウラシル N−グリコシラーゼ(UNG)
   (3) TaqMan HIV-1 マンガン試液〔CAP/CTM Mn^{2+}〕 1×19.8 mL
5. **TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0**
   〔HIV-1 H(+)C, v2.0〕※1 4×1.0 mL
6. **TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0**
   〔HIV-1 L(+)C, v2.0〕※1 4×1.0 mL
7. **コバス TaqMan (−)コントロール〔CTM(−)C〕**※1 4×1.0 mL
8. **コントロール用クリップ**
   (1) HIV-1 H(+)C, v2.0 用バーコードクリップ 4個
   (2) HIV-1 L(+)C, v2.0 用バーコードクリップ 4個
   (3) HIV-1 (−)C 用バーコードクリップ 4個

※1ヒト血液由来成分を含みます。詳細は【全般的な注意】の項及び【使用上又は取扱い上の注意】の項「1. 取扱い上(危険防止)の注意」を参照してください。

【使用目的】

血漿中の HIV-1 RNA の測定(HIV-1 ウイルス感染症の診断の補助)

【測定原理】

1. **本キットの測定は以下の3つのステップからなります。**
   (1) **試料の調製**
   検体前処理装置「コバス AmpliPrep」により自動で行います。検体又はコントロールと TaqMan プロテアーゼ試液及び既知量の定量標準 RNA(HIV-1 QS RNA)を含む TaqMan HIV-1 QS の混合液に、イソプロピルアルコールを含む TaqMan 磁性粒子懸濁液及びカオトロピック塩を含む TaqMan 溶解試液を添加してインキュベーションします。これによりウイルスが溶解し、試料中の核酸は磁性粒子に吸着します。核酸が吸着した磁性粒子は、磁石により捕らえられて固定され、溶解したウイルスのたん白などの不要な成分は洗浄により除去されます(B/F 分離)。これに TaqMan 溶出試液を加えて核酸を抽出し、最後に TaqMan HIV-1 マスターミックス v2.0 と TaqMan HIV-1 マンガン試液を加えて試料とします。
   (2) **逆転写反応による標的 RNA から逆転写 DNA の合成**
   遺伝子解析装置「コバス TaqMan」又は「コバス TaqMan 48」により自動で行います。Mn^{2+}の存在下、逆転写活性と DNA ポリメラーゼ活性を併せ持つ耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼにより逆転写反応を行い、HIV-1 RNA 及び HIV-1 QS RNA に相補的な逆転写 DNA(cDNA)が合成されます。
   (3) **増幅及び測定**
   リアルタイム PCR(Polymerase Chain Reaction)法[1),2)]を応用し、(2)に引き続き、遺伝子解析装置「コバス TaqMan」又は「コバス TaqMan 48」により自動で行います。測定には蛍光色素(レポーター)及び消光物質(クエンチャー)で標識した HIV-1 用及び HIV-1 QS 用 DNA プローブを用います。このプローブの蛍光色素は、レポーターとクエンチャーが近くに存在する場合は、クエンチャーにより蛍光が消光され強い蛍光を発することはありませんが、レポーターとクエンチャーが切り離された場合は、レポーターが遊離するために強い蛍光を発するようになります。(2)で合成された cDNA を高温で1本鎖に変性させます(2サイクル目以後は、増幅した2本鎖 DNA を同様に高温で1本鎖に変性させます)。温度を下げると HIV-1 用及び HIV-1 QS 用 DNA プローブが標的配列とハイブリダイズします。また、プライマーが標的配列の 3'末端側へアニールし、Mn^{2+}及びデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)存在下、耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼの働きにより標的配列に相補的な DNA 鎖が伸長されます。DNA 鎖の伸長と同時に既に標的配列とハイブリダイズしている HIV-1 用及び HIV-1 QS 用 DNA プローブは Z05 の 5'→3'エクソヌクレアーゼ活性により分解され蛍光を発します。この蛍光強度を HIV-1 用蛍光色素及び HIV-1 QS 用蛍光色素それぞれに固有の異なる波長で測定します。この「熱変性」、「DNA プローブと標的配列のハイブリダイズ」、「プライマーのアニーリング」、「耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼによる相補鎖の伸長と DNA プローブの分解による蛍光発光」、「蛍光強度の測定」を所定のサイクルで連続的に繰り返し、各サイクルの PCR 産物をリアルタイムにモニターしながら増幅曲線を作成します。作成した増幅曲線より蛍光強度が一定量以上となるサイクル数を求め、Ct 値(critical threshold value)とします。HIV-1 QS RNA の Ct 値と反応液中 HIV-1 RNA の Ct 値を比較して試料中の HIV-1 RNA 濃度を算出します。
2. **本キットの特徴**
   本キットは、弊社既承認品 コバス TaqMan HIV-1「オート」(v1.0 法)の改良品です。本品は v1.0 法で用いている HIV-1 RNA の *gag* 遺伝子内の標的配列に対するプライマー及び DNA プローブに加え、HIV-1 RNA の LTR 領域を標的配列とするプライマー及び DNA プローブを合わせて使用することで、HIV-1 RNA グループ M の定量性の向上と、HIV-1 RNA グループ O の測定を可能としています。そのため、v1.0 法において既承認品 コバス アンプリコア HIV-1 モニター v1.5 より低値に測定される検体の定量性についても改善されています。
3. **キャリーオーバーコンタミネーションの防止**
   本キットでは、以下の方法により増幅された DNA 産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる誤測定を最小限に抑制しています。DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて増幅反応を行うため、増幅された DNA の塩基配列はチミン(T)がウラシル(U)に全て置き換わっています。また、この系で増幅された DNA が新たに試験する試料中へ混入した場合、マスターミックスに含まれているウラシル N−グリコシラーゼ(UNG)が作用し DNA 中の U

塩基は除去されます。塩基を失った DNA は構造上極めて不安定な分子であり、増幅反応の最初の加熱によりリン酸結合が切断され、新たな増幅の鋳型とはなり得ません。UNG は高温で失活するため、それ以後に増幅されてくる U 塩基を含む増幅 DNA は影響を受けません。また、UNG は6塩基以上の DNA 上のウラシルのみに反応し、モノマーの dUTP や RNA 上のウラシルには作用しません[3)]。

**【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

本キットの測定試料には、血漿を用います。抗凝固剤には EDTA を使用してください。ヘパリンは PCR 反応を阻害しますので使用しないでください。採血後、全血を2～25℃で 24 時間以内に遠心して血漿を分離し、ポリプロピレン製滅菌チューブに移してください。測定血漿検体の遠心分離にあたっては 1200±400 g で 20 分間の遠心分離を実施してください。血漿検体は2～8℃で6日間、25～30℃で1日間、-80～-20℃で6週間保存できますが、1ヵ月を超えるような長期保存の場合は-70℃以下で保存することをお勧めします。凍結保存融解後はよく混和してから使用してください。ただし、凍結融解の繰り返しはできるだけ避けてください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

ヘモグロビン、トリグリセライド、ビリルビン、ヒト血清アルブミン及びヒト DNA による影響を検討するため、各妨害物質の臨床検体もしくは添加検体に HIV-1 陽性 EDTA 血漿パネルを最終濃度 150 コピー/mL となるよう添加して本キットで測定したところ、以下の濃度まで測定値への影響は認められませんでした。また、自己免疫疾患による影響を検討するため、抗核抗体(ANA)、全身性エリテマトーデス(SLE)及び慢性関節リウマチ(RA)の臨床検体についても同様に試験をしたところ、測定値への影響は認められませんでした。

ヒト血清アルブミン	8,900 mg/dL
ビリルビン	28 mg/dL
ヘモグロビン	900 mg/dL
トリグリセライド	3,500 mg/dL
ヒト DNA	0.4 mg/dL

以下の測定に影響を及ぼす可能性のある薬剤について、HIV-1 陽性 EDTA 血漿検体(HIV-1 RNA 濃度約 150 コピー/mL)に添加して本キットで測定したところ、以下の濃度まで測定値への影響は認められませんでした。

薬剤名	作用機序	試験実施濃度
ジドブジン	逆転写酵素阻害剤	3.18 μg/mL
ラミブジン		4.50 μg/mL
硫酸アバカビル		9.00 μg/mL
ジダノシン		6.96 μg/mL
スタブジン		12.45 μg/mL
テノフォビル DF		9.78 μg/mL
エントリシタビン		3.30 μg/mL
アタザナビル	プロテアーゼ阻害剤	15.69 μg/mL
サキナビル		7.44 μg/mL
リトナビル		33.60 μg/mL
ロピナビル／リトナビル		28.80 μg/mL (ロピナビル)
メシル酸ネルフィナビル		12.00 μg/mL
ダルナビル		18.60 μg/mL
ティプラナビル		285.00 μmol/L
フォサンプレナビル		23.79 μg/mL
エファビレンツ	非核酸系逆転写酵素阻害剤	12.21 μg/mL
ネビラピン		13.50 μg/mL
マラビロク	侵入阻害剤	1.86 μg/mL
ラルテグラビル	インテグラーゼ阻害剤	12.00 μmol/L
エンヒュービルタイド	融合阻害剤	15.00 μg/mL
アデフォビル・ジピポキシル	HBV 核酸類似物質	55.20 ng/mL
エンテカビル	核酸類似物質	24.30 ng/mL
テルビブジン		10.20 μg/mL
ペグインターフェロン アルファ-2b	抗 HCV 薬	2.10 ng/mL
リバビリン		6.60 μg/mL
ペグインターフェロン アルファ-2a	抗 HBV/HCV 薬	84.00ng/mL
ガンシクロビル	抗 CMV 薬	27.00 μg/mL
塩酸バルガンシクロビル		16.83 μg/mL
アシクロビル	抗 HSV, VZV 薬	4.83 μg/mL

3. 反応特異性

HIV-1グループ M サブタイプ A～H 及び HIV-1 グループ O の HIV-1 感染細胞培養上清から精製した試料についてそれぞれを4濃度(約 10、30、50 及び 75 コピー/mL)となるように調製し、本キットを用いて 24 重測定を行ったところ、95%以上の Hit Rate(シグナルが検出された試料数／正しく測定された試料数 × 100)が得られる HIV-1 RNA 濃度は HIV-1 グループ M サブタイプ A～H が 10～32 コピー/mL、HIV-1 グループ O が 20 コピー/mL でした。

4. 交差反応性

Staphylococcus aureus、*Candida albicans*、*Propionibacterium acnes*、*Adenovirus type 5*、Cytomegalovirus、Epstein-Barr virus、Human Herpes Virus type 6、Herpes simplex virus type 1、Herpes simplex virus type 2、Human T-Cell Lymphotropic virus type 1、Human T-Cell Lymphotropic virus type 2、Influenza A、Hepatitis A virus、Hepatitis B virus、Hepatitis C virus の高濃度溶液を HIV-1 陰性 EDTA 血漿で希釈したものに、HIV-1 RNA 最終濃度約 1.5×10^2コピー/mL となるよう添加した試料を本キットで測定をしたところ、交差反応性は認められませんでした。

5. コンタミネーションの防止法

本キットでは TaqMan HIV-1 マスターミックスにウラシル N-グリコシラーゼ(UNG)が添加されており、また、Taq DNA ポリメラーゼによる DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて PCR を行います。したがって、本キットにて増幅された DNA のキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することはできますが、検体間で発生するクロスコンタミネーションを防止することはできません。クロスコンタミネーションは、主に検体を扱ったピペットなどで発生するエアロゾルやピペット本体の汚染が原因となりますので、検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃を徹底することで、クロスコンタミネーションを最小限に防止することができます。したがって、本キットの測定に当たっては次の事項を徹底するようにしてください。

(1) 検体及びコントロールをサンプルチューブ(S チューブ)に分注する際は、安全キャビネットを利用するなどバイオセーフティー/バイオハザードに準拠した環境で実施してください。専用のピペットとチップなどを用意し、ほかの場所との共用は避けてください。ここで使用する器具や保護衣をほかの場所に持ち込まないでください。また、分注時には、すべて静かに操作してエアロゾルの発生をできる限り防止してください。

(2) 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる RNase や DNase が少量でも検体に混入しますと、RNA や DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。

(3) 実験台及び使用器具などが検体や増幅 DNA で汚染された場合は、用時調製した次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)でよく拭き取るか、紫外線照射をじゅうぶん行ってください。なお、ピペットなどの内部が汚染されたと判断された場合は、直ちにその使用を中止して新しい器具に交換してください。

以上の事項に従っても、クロスコンタミネーションが起こる可能性がありますので、結果の判定にはじゅうぶん注意してください。

6. その他の留意事項

試料中に PCR の妨害物質が存在すると正しい判定結果が得られないので注意してください。また、試料中に標的 RNA が存在しても最小検出感度以下である場合には Target Not Detected(検出せず)と判定されることがありますので注意してください。

**【用法・用量(操作方法)】

1. 試液の調製方法及び安定性

すべての試薬はそのまま用います。

各試薬は、2～8℃保存から取り出したら直ちに「コバス AmpliPrep」にセットしてください。試料測定の少なくとも 30 分前にはコバス AmpliPrep 内の温度にしてから使用してください。試薬の温度が低い場合に反応がじゅうぶんでないため、本来の性能が得られないことがあります。バーコードに水滴がつかないよう、各試薬カセットはコバス AmpliPrep の外に放置しないでください。また、バーコードについた水滴はふき取らないでください。

2. 別途必要な器具・器材・試料等

(1) K チューブラック※1
(2) K キャリア※1
(3) K キャリアラック(CAP/CTM48)※1
(4) K キャリア トランスポーター※1
(5) サンプル処理ユニット【SPU】(CAP)※1:Sample Processing Units、検体又はコントロールと各試薬の混合など、試料の調製に用いる反応容器
(6) サンプル処理ユニット【SPU】ラック(CAP)※1
(7) S チューブ(CAP) (バーコードクリップ付) ※1:検体又はコントロールを分注するチューブ
(8) サンプル ラック(CAP/CTM)※1
(9) K チップラック(CAP)※1
(10) 試薬ラック(CAP)※1
(11) 洗浄試薬(CAP)※2
(12) 検体前処理装置「コバス AmpliPrep」
(13) 全自動 PCR 測定装置「コバス TaqMan」又は「コバス TaqMan 48」
(14) ドッキングステーション(「コバス AmpliPrep」と「コバス TaqMan」をドッキングして使用する場合)
(15) アンプリリンク ソフトウェア
(16) アンプリリンク用データステーション及びプリンター
(17) コバス TaqMan HIV-1「オート」用 CD
(18) 安全キャビネット(陰圧)
(19) ゴム手袋(パウダーフリー)

※1「コバス TaqMan」又は「コバス TaqMan 48」専用の消耗品を使用してください。
※2 別売品の専用試液を使用してください。
検体及びコントロールの分注専用として下記を用意してください(安全キャビネット内で使用します)。
(1) 試験管ミキサー
(2) マイクロピペット(1,000μL)及びチップ
(チップは疎水性フィルター付きで、1,000μL 用)
(3) ゴム手袋(パウダーフリー)

3. 操作方法

1測定につきコントロールとして TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 H(+)C, v2.0〕、TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 L(+)C, v2.0〕、及びコバス TaqMan (−)コントロール〔CTM(−)C〕を測定し、精度管理を行ってください。

(1) 試料の調製

① コバス AmpliPrep の準備

(a) 本体のスイッチを入れて機械の始動を確認します(通常はスタンバイモードです)。
(b) データステーションのスイッチをオンし、Windows にログオンします。
(c) アンプリリンクを開き、ユーザーID 及びパスワードを入力してログオンします。
(d) 取扱説明書に従って洗浄試薬と廃液コンテナをチェックし、必要に応じて廃棄及び交換を行います。更に、取扱説明書に従って日常保守点検を行います。

② コバス TaqMan の準備

(a) コバス TaqMan のメインカバーを開けて 24 本の空の K チューブをセットした K キャリアを、作業エリアの左側にある K キャリア停止位置2にセットします(既にセットされている場合はこの作業は不要です)。
(b) 本体のスイッチを入れて機械の始動を確認します(通常はスタンバイモードです)。
(c) アンプリリンクの“System”ボタンをクリックし、“Service Due”タブを選択し、必要な保守点検があるかを確認し、ある場合は実行します。

③ コバス TaqMan 48 の準備

(a) 本体のスイッチを入れて機械の始動を確認します(通常はスタンバイモードです)。
(b) アンプリリンクの“System”ボタンをクリックし、“Service Due”タブを選択し、必要な保守点検があるかを確認し、ある場合は実行します。

④ 試薬のロード(セット)

試薬は使用する 30 分前には保管場所から取り出し、直ちに「コバス AmpliPrep」にロード(セット)してください。
(a) TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット1〔HIV-1 v2.0 CS1〕を試薬ラックにのせ、「コバス AmpliPrep」のラックポジション A にロードします。
(b) TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット2〔HIV-1 v2.0 CS2〕、TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット3〔HIV-1 v2.0 CS3〕及び TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット4〔HIV-1 v2.0 CS4〕を別の試薬ラックにのせ、「コバス AmpliPrep」のラックポジション B〜E のいずれかにのせます。

⑤ 消耗品のロード(セット)

検体及びコントロール1つにつき、SPU、S チューブ、K チューブ及び K チップ各1つが必要です。測定に必要な数を確認し、準備します。必要な試薬ラック、消耗品及びロードするラックポジションは、増幅及び測定に用いる機器の組み合わせにより異なります。右表を参照して準備してください。
(a) SPU を SPU ラックにセットし、ラックポジション J、K 又は L にセットします。
(b) 「コバス TaqMan」を用いる場合は、K チューブラックにセットされている K チューブをラックポジション M〜P にセットします。
(c) K チップラックにセットされている K チップをラックポジション M〜P にセットします。
(d) 「コバス TaqMan 48」を用いる場合は、K キャリアラックにセットした K キャリアをラックポジション M〜P にセットします。
組み合わせについては、右表を参照してください。

⑥ 試料のオーダー(登録)とロード(セット)

(a) サンプルラックの検体用 S チューブを置く位置にバーコードクリップを取り付けます。また、各コントロール用 S チューブを置く位置に専用バーコードクリップ(キット付属)を取り付けます。バーコードクリップを取り付けた各サンプルラックの位置に S チューブをセットします。
(b) アンプリリンクのアプリケーションバーにある“Orders”ボタンをクリックします。“Sample”タブを選択し、“New”ボタンをクリックし検体及びコントロールのオーダーを作成します。“Sample-Rack”タブで検体及びコントロールオーダーをサンプルラック位置に割り当てます。試験するすべての試料について“HI2CAP96”又は“HI2CAP48”が表示されていることを確認し、“Save”ボタンを押して保存します。
(c) “Sample-Rack”タブの左のパネルでラック ID を指定し、“Print”ボタンを選択してサンプルラック オーダーを印刷します。血漿検体で採血管のまま保存又は移送されたものは、1200±400 g で 20 分間遠心分離を実施し、残存リンパ球を沈降させてください。また、検体は液面の上方より分取し、分離剤付近からは分取しないでください。
(d) 検体及びコントロールを試験管ミキサーにて3〜5秒間混和します。分離剤入り採血管のまま保存・輸送されたものは、1,200±400 g で 20 分間の遠心分離を実施してください。また、検体は液面の上方より分取し、分離剤付近からは分取しないでください。
(e) S チューブのキャップを回してはずし、それぞれオーダーで割り当てられた位置に検体及びコントロールを 1,000〜1,050 μL 分注します。S チューブのキャップを回して締めます。
(f) 下表の組み合わせ1及び2の場合は、サンプルラックをラックポジション F、G 又は H にセットします。 組み合わせ3〜5の場合(増幅及び測定に「コバス TaqMan 48」を用いる場合)は、検体又はコントロールを分注した S チューブの隣に K チューブをセットしてからサンプルラックをラックポジション F、G 又は H にセットします。その際、サンプルラックは静かに取り扱い、S チューブのキャップに検体及びコントロールが付着しないよう注意してください。

⑦ 「コバス AmpliPrep」による試料の調製開始

(a) アンプリリンクのアプリケーションバーにある“System”ボタンをクリックし、“System”タブを選択し、試薬カセット、試料及びシステムの状態を確認します。
(b) “Start”ボタンをクリックして処理を開始します。

⑧ 「コバス AmpliPrep」による試料の調製終了後の操作(増幅及び測定に用いる機器の組み合わせ1においては不要です)

(a) アンプリリンクのアプリケーションバーにある“Messages”ボタンをクリックし、エラーがないことを確認します。
(b) “System”ボタンをクリックし、“Samples”タブを選択し、正常に試料が処理されたことを確認します。
(c) 調製済み試料の入ったサンプルラック(増幅及び測定に「コバス TaqMan」を用いる場合)又は K キャリアラック(増幅及び測定に「コバス TaqMan 48」を用いる場合)を取り出します(詳細は「(2)増幅と測定」の項、①を参照してください)。調製済み試料は直射日光から保護してください。

組み合わせ

組み合わせ		調製済み試料の移動方法 「コバス AmpliPrep」 ↓ 「コバス TaqMan」 又は 「コバス TaqMan 48」	ラック、キャリア、消耗品	「コバス AmpliPrep」ラックポジション
1	コバス AmpliPrep (ドッキングステーション付) ＋ コバス TaqMan	自動	K チューブラック	M 〜 P
			K チップラック	M 〜 P
			S チューブセット済サンプルラック	F 〜 H
			SPU セット済 SPU ラック	J 〜 L
			HIV-1 v2.0 CS1セット済試薬ラック	A
			HIV-1 v2.0 CS2、CS3、CS4セット済試薬ラック	B 〜 E
2	コバス AmpliPrep ＋ コバス TaqMan	手動 (K チューブをサンプルラックごとコバス TaqMan にセット)	K チューブラック	M 〜 P
			K チップラック	M 〜 P
			S チューブセット済サンプルラック	F 〜 H
			SPU セット済 SPU ラック	J 〜 L
			HIV-1 v2.0 CS1セット済試薬ラック	A

			HIV-1 v2.0 CS2、CS3、CS4セット済試薬ラック	B ～ E
			試料の調製が終了すると、Kチューブはサンプルラックにセットされています(手動でコバス TaqMan に移動します)。	(F ～ H)
3	コバス AmpliPrep ＋ コバス TaqMan 48	手動 (K チューブを K キャリアごとコバス TaqMan 48 にセット)	Kチューブラック	F ～ H
			K チップラック	M ～ P
			S チューブセット済サンプルラック	F ～ H
			SPU セット済 SPU ラック	J ～ L
			HIV-1 v2.0 CS1セット済試薬ラック	A
			HIV-1 v2.0 CS2、CS3、CS4セット済試薬ラック	B ～ E
			K キャリアセット済 K キャリアラック	M ～ P
			試料の調製が終了すると、Kキャリアに入った K チューブが K キャリアラックにセットされています(手動でコバス TaqMan 48 に移動します)。	(M ～ P)
4	コバス AmpliPrep ＋ コバス TaqMan ＋ コバス TaqMan 48	手動 (K チューブはサンプルラックごとコバス TaqMan に、K チューブは K キャリアごとコバス TaqMan 48 にセット)	組み合わせ 2、3と同様	組み合わせ 2、3と同様

(2) 増幅と測定

調製が終了した試料は、120 分以内に増幅操作を開始してください。調製済みの試料は凍結又は2～8℃で保存しないでください。

① 調製済み試料の移動

増幅及び測定に用いる機器の組み合わせにより操作が異なりますので下記を参照してください。

組み合わせ1: K キャリアが自動的に「コバス AmpliPrep」から「コバス TaqMan」に移動します。

組み合わせ2、4: 調製済み試料入り K チューブがセットされたサンプルラックを手動で「コバス TaqMan」のサンプルラックロードエリアにセットします。

組み合わせ3、4: 調製済み試料入り K チューブがセットされた K キャリアを、K キャリアトランスポーターを用いて手動で「コバス TaqMan 48」にセットします。

② 測定の開始

増幅及び測定に用いる機器の組み合わせにより操作が異なりますので下記を参照してください。

組み合わせ1: 自動で測定が開始します。

組み合わせ2、4: 「コバス TaqMan」にサンプルラックがセットされると、自動的に測定が開始します。

組み合わせ3、4: 取扱説明書を参照し、「コバス TaqMan 48」のサーマルサイクラーのふたを開けて K キャリアをセットします。ふたを閉じ、アンプリリンクの“System”タブにある“Start”ボタンを押して測定を開始します。

③ 測定の終了

測定が終了したら、結果を印刷します。使用済みの K チューブを「コバス TaqMan」又は「コバス TaqMan 48」から取り外してください。

各機器の操作の詳細については、取扱説明書を参照してください。操作の概略は最終ページの図を参照してください。

4. HIV-1 RNA 濃度の算出

検体中の HIV-1 RNA は既知量の定量標準 RNA(HIV-1 QS RNA)と共に逆転写反応後、PCR により増幅されます。この PCR による増幅産物をサイクルごとにリアルタイムにモニターしながら、反応液中の HIV-1 RNA 及び HIV-1 QS RNA の増幅曲線を作成します。作成した増幅曲線より発光強度が一定量以上となるサイクル数を求め、Ct 値(critical threshold value)とします。HIV-1 QS RNA の Ct 値と反応液中 HIV-1 RNA の Ct 値を比較して試料中の HIV-1 RNA 濃度を全自動で算出します。

【測定結果の判定法】

1. 測定結果の判定

「コバス TaqMan」又は「コバス TaqMan 48」では検体及びコントロールの HIV-1 RNA 濃度算定を自動で行います。HIV-1 RNA 量は、コピー/mL で表示されます。各コントロールについて、測定画面又は印字用紙に結果とともに記されるフラグ及びコメントをチェックして、測定が正しく行われたことを確認します。コントロールの測定結果のコメントにつきましては下表を参照してください。

コメント	解釈
QS_INVALID	定量標準 DNA の Ct 値が検査用ファイルのパラメーターの範囲を外れている。
_N_NC_INVALID	コバス TaqMan (-)コントロールの測定で、Target Not Detected が表示されていない、又は測定無効
_L_LPCINVALID	TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0 の測定値が許容範囲から外れている、又は測定無効
_H_HPCINVALID	TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0 の測定値が許容範囲から外れている、又は測定無効

各測定検体についても同様にフラグ及びコメントをチェックします。検体の測定結果については以下のとおり表示されます。検体測定結果のフラグにつきましては、各機器の取扱説明書を参照してください。

検体の判定結果

機器における測定結果の“表示”、“印字”	解釈
>1.00E+07 cp/mL	1.0×10^7 コピー/mL を超えた
X.XXE+XX cp/mL	測定範囲内で結果を得た
<2.00E+01 cp/mL	20 コピー/mL 未満であるが HIV-1 増幅反応シグナルは検出した
Target Not Detected	HIV-1 増幅反応シグナルを検出しなかった
Invalid	測定が無効であり、再度検体からの再検を行う必要がある

※ 「cp/mL」:「コピー/mL」を示します。

※ 「X.XXE+XX cp/mL」の表示例(「1.23E+05 cp/mL」と表示された場合):「1.23×10^5 コピー/mL」を示します。

報告例については下記のとおりです。

	報告例 ①	報告例 ②	
機器における測定結果の“表示”、“印字”	結果	結果	HIV-1 増幅反応ｼｸﾞﾅﾙ
>1.00E+07 cp/mL	$>1.0\times10^7$ コピー/mL	$>1.0\times10^7$ コピー/mL	検出
X.XXE+XX cp/mL	$X.X\times10^n$ コピー/mL	$X.X\times10^n$ コピー/mL	検出
<2.00E+01 cp/mL	$<2.0\times10^1$ コピー/mL	$<2.0\times10^1$ コピー/mL	検出
Target Not Detected	検出せず	$<2.0\times10^1$ コピー/mL	検出せず

あらかじめ高値(測定上限を超える)が予測される検体、測定結果が測定上限(1.0×10^7 コピー/mL)を越えたケースで測定値が必要な場合、又は、高濃度が原因と考えられる QS_INVALID などのフラグが発生した検体※1は、高濃度領域測定法※2にて測定を実施し、その結果を報告してください。

※1 HIV-1 RNA量が高濃度の場合、QS_INVALID のフラグが発生することがあります。アンプリリンク上の測定結果の画面で“Measurement Detail”のタブをクリックしてPCR増幅曲線を確認してください。

※2 高濃度領域測定法の「操作方法」は以下の手順に従って実施してください(2倍希釈の場合)。

（1） 試料の調製
【用法・用量(操作方法)】の項、「3. 操作方法 (1)試料の調製」の手順に従って実施、⑥-(e)のステップにおいて、以下の操作を行ってください。なお、コントロールは希釈せずに測定を行ってください。検体 500 μL と HIV-1 陰性ヒト EDTA 血漿 500 μL をスクリューキャップ付き 1.5 mL 用チューブに分注、試験管ミキサーを用い 10 秒間混和・スピンダウンを行った後、全量を S チューブに分注します。試料分注済み S チューブはオーダーで割り当てられたサンプルラックの元の位置に戻します。

（2） 増幅と測定
【用法・用量(操作方法)】の項、「3. 操作方法 (2)増幅と測定」の手順に従って実施してください。

（3） HIV-1 RNA 濃度の算出
【用法・用量(操作方法)】の項、「4. HIV-1 RNA 濃度の算出」を参照のうえ、算出された結果を2倍して測定結果とします。

2. 結果の判定にかかる注意
（1） 以下の検体を測定した場合、誤判定となることがありますので注意してください。
① EDTA 血漿以外の検体
② -20℃より高い温度で長期間保存された検体
③ 凍結と融解を5回より多く繰り返した検体
④ HIV-1 RNA のコンタミネーションを受けた検体
上記のような検体の場合は、適切な検体を再度採取し測定を行ってください。RNA 抽出操作及び測定操作が不適切であると判断された場合は、再度測定してください。

（2） HIV-1 感染後、ある程度以上の HIV-1 RNA 濃度となるまで検出することができない場合があります。また、本キットのプライマーやプローブの塩基配列と試料中の HIV-1 RNA の塩基配列との相違が大きくなると、測定値が低くなるか測定できない可能性もありますので、判定にはじゅうぶん注意してください。そのほかの原因でも“検出せず”となる可能性がありますので、本キットで“検出せず”と判定されても必ずしも HIV-1 の存在を否定するものではありません。測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。

（3） 反応の阻害などにより PCR における増幅効率が低下した場合、増幅曲線に対しソフトウェアの解析アルゴリズムが対応できないケースが稀に発生することがありますので、注意してください。測定結果の報告に際しましては、臨床症状やほかの検査結果などと一致しない場合は、増幅曲線を確認し、曲線の乱れやベースライン補正(normalize 処理)に問題がないことを確認してください。増幅曲線に問題が確認された場合は、再度測定してください。

【性能】

1. 性能
【用法・用量(操作方法)】の記載に従い、感度・正確性・同時再現性の各試験を行った場合、下記の規格値に適合します。

（1） 感度試験
「管理用試料1(HIV-1 RNA 濃度 約 200 コピー/mL)」を試料として操作した場合の Hit Rate%(シグナルが検出された試料数/正しく測定された試料数×100)は 95%以上です。

（2） 正確性試験
「HIV-1 2次標準」を測定するとき、対数変換した測定値は既知濃度の対数変換値の±0.5 の範囲内です。
「TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0」及び「TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0」を測定するとき、測定値はそれぞれ設定した濃度範囲内です。

（3） 同時再現性試験
「HIV-1 2次標準」を 10 回同時に測定するとき、測定は9回以上有効であり、測定値の変動係数は 35%以下です。
「管理用試料2(HIV-1 RNA 濃度 約 1.0×10^5 コピー/mL)」及び「管理用試料3(HIV-1 RNA 濃度 約 1.0×10^6 コピー/mL)」を4回同時に測定するとき、測定は3回以上有効であり、測定値はそれぞれ設定した濃度範囲内です。

（4） 測定範囲
測定下限(最小検出感度※):20 コピー/mL
測定上限: 1.0×10^7 コピー/mL
※ 95%以上の検出率が得られる濃度

2. 相関性試験成績
（1） 既存製品との相関-1
本品及び既承認品共に測定範囲内で結果が得られた血漿検体 86 例を試料として、本品と既承認品の比較検討を行ったところ良好な結果が得られました。
相関係数 r = 0.970
回帰式 y = 0.928x + 0.203
y:本品 x:既承認品

（2） 既存製品との相関-2
本品及び既承認品共に測定範囲内で結果が得られた血漿検体 96 例を試料として、本品と既承認品の比較検討を行ったところ良好な結果が得られました。
相関係数 r = 0.954
回帰式 y = 1.013x + 0.181
y:本品 x:既承認品

3. 較正用の基準物質(標準品)
NIBSC WHO Int. std. HIV-1

**【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意
（1） 検体及び本キットの取扱いには、使い捨て手袋、実験着などの保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。また、測定終了後はよく手を洗ってください。
（2） ピペットは口で吸わないでください。
（3） 試薬が誤って目や口に入った場合には、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
（4） 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。
（5） 試薬をこぼした場合には水で希釈してから拭き取ってください。
（6） 検体又はヒト血液由来成分を含む構成試薬(TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 H(+)C, v2.0〕、TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 L(+)C, v2.0〕及びコバス TaqMan (−)コントロール〔CTM(−)C〕)をこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
（7） 検体及び本キットを取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。
（8） 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。ヒト血液由来成分を含む構成試薬(TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 H(+)C, v2.0〕、TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 L(+)C, v2.0〕及びコバス TaqMan (−)コントロール〔CTM(−)C〕)は、HBs 抗原、抗 HIV-1/2 抗体及び HIV p24 抗原、抗 HCV 抗体、HIV-1 RNA、HCV RNA 、HBV DNA の陰性が確認されていますが、感染性がないことを完全に保証する試験方法はないため、検体と同様に感染性を有するものとして、施設の安全規定に従って取り扱ってください。
（9） 検体及びヒト血液由来成分を含む構成試薬(TaqMan HIV-1 高値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 H(+)C, v2.0〕、TaqMan HIV-1 低値(+)コントロール v2.0〔HIV-1 L(+)C, v2.0〕及びコバス TaqMan (−)コントロール〔CTM(−)C〕)を取り扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理をするか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に1時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中はじゅうぶんに換気を行ってください。
（10） TaqMan HIV-1 v2.0 試液カセット1〔HIV-1 v2.0 CS1〕は 93%のイソプロピルアルコールを含んでいます。イソプロピルアルコールは引火性を有するため、火気のある場所での使用は避けてください。作業場所には局所廃棄装置を設けてください。一定の場所を定めて保管し、容器から出し入れするときにはこぼれないように注意してください。また、使用中はできるだけ皮膚に触れないようにし、必要に応じて防毒マスク又は送気マスク、保護用手袋などを着用してください。使用後はじゅうぶんに手を洗ってください。

2. 使用上の注意
（1） プライマー及びプローブは、測定するウイルスの遺伝子の中でも保存性が高く変異が少ない遺伝子領域を反応のターゲットとしておりますが、稀に起こる遺伝子の変異や欠損/挿入などにより、反応性が低下し正確に測定できない場合や検出できない場合があります。
（2） ウイルスの RNA の測定・検出の結果は、検体採取の方法や感染の進行度などの患者因子の影響を受ける場合があります。
（3） 従来の測定方法から新しい測定方法に変更する場合は、変更前後の測定方法の相関性などを確認のうえご利用ください。
（4） 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
（5） 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結させるなど指定の条件以外で保存したものや使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
（6） ロットの異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないでください。
（7） バーコードをぬらしたり、ペンで記入するなどして汚したりしないでください。
（8） すべての構成試薬は使用前に 15～25℃に戻してから使用してください。また、使用後は再び2～8℃で保存してください。
（9） 使用開始後の試薬は微生物の汚染にご注意ください。
（10） 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃などを徹底して行ってください。
（11） 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる RNase 又は DNase が少量でも検体に混入しますと、RNA や DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。

(12) TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット1〔HIV-1 v2.0 CS1〕、TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット2〔HIV-1 v2.0 CS2〕、TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット3〔HIV-1 v2.0 CS3〕及びTaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット4〔HIV-1 v2.0 CS4〕について、一度使用した試薬は、2～8℃で 28 日又は使用期限のうち、短い日付まで安定です。これらの試薬は測定合計時間 64 時間までの使用が可能です。測定終了後は2～8℃で保存してください。

(13) バーコードクリップは開封後、2～30℃で保存してください。

3．廃棄上の注意

(1) 測定により生じた廃液については、検体などと同様に滅菌又は消毒の処理を行ってください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。

(2) 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。

(3) 遺伝子検査後の核酸試料及び増幅された DNA の廃棄は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度が 5,000 ppm(0.5%)になるように混和後一晩放置するなど、DNA を破壊してから廃棄してください。

(4) DNA を扱ったピペットチップ及びプラスチック容器などは、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に一晩浸すなどにより DNA を破壊してから、焼却処理又は密閉できるビニール袋を2重に施し、医療廃棄物として処理してください。

(5) DNA を含む溶液は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度が5,000 ppm(0.5%)になるように混和後一晩放置するなど、DNAを破壊してから、各都道府県によって定められた規定に従って廃液処理してください。

(6) 廃棄する際は、水質汚濁防止法等の規制に留意して処理してください。

(7) 検体及び試薬をこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。

(8) TaqMan HIV-1 マスターミックス v2.0〔HIV-1 MMX〕及びTaqMan HIV-1 マンガン試液〔CAP/CTM Mn^{2+}〕は 0.09%アジ化ナトリウム、TaqMan HIV-1 QS〔HIV-1 QS〕は 0.05%アジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性のある金属アジドを生成することがあるため、廃棄の際には多量の水で洗い流してください。

(9) TaqMan HIV-1 v2.0 試薬カセット2〔HIV-1 v2.0 CS2〕及びコバス AmpliPrep から出た廃液はチオシアン化グアニジンを含みます。チオシアン化グアニジンは次亜塩素酸剤と反応して有毒ガスを発生することがありますので、次亜塩素酸剤と接触させないでください。

(10) 使用済み SPU はチオシアン化グアニジンを含みます。チオシアン化グアニジンは次亜塩素酸剤と反応して有毒ガスを発生することがありますので、次亜塩素酸剤と接触させないでください。

4．その他の注意

本品による測定値は既存製品と高い相関性を示しますが、系統的な誤差を生じる場合がありますので、必要に応じて相関性について検討されることをお勧めします。

*【貯蔵方法・有効期間】

1．貯蔵方法

2～8℃

2．有効期間

22 ヵ月

使用期限(Exp.)は外箱に記載してあります。

【包装単位】

コバス TaqMan HIV-1 「オート」 v2.0　　48テスト

(各構成試薬の詳細につきましては、【形状・構造等(キットの構成)】を参照してください)

【主要文献】

1) Higuchi, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y). 1992, 10, p.413～417.
2) Heid, C.A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Research. 1996, 6, p.986～994.
3) Longo, M.C. et al. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990, 93, p.125～128.

【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
カスタマーサポートセンター
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
フリーダイヤル: 0120-600-152

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

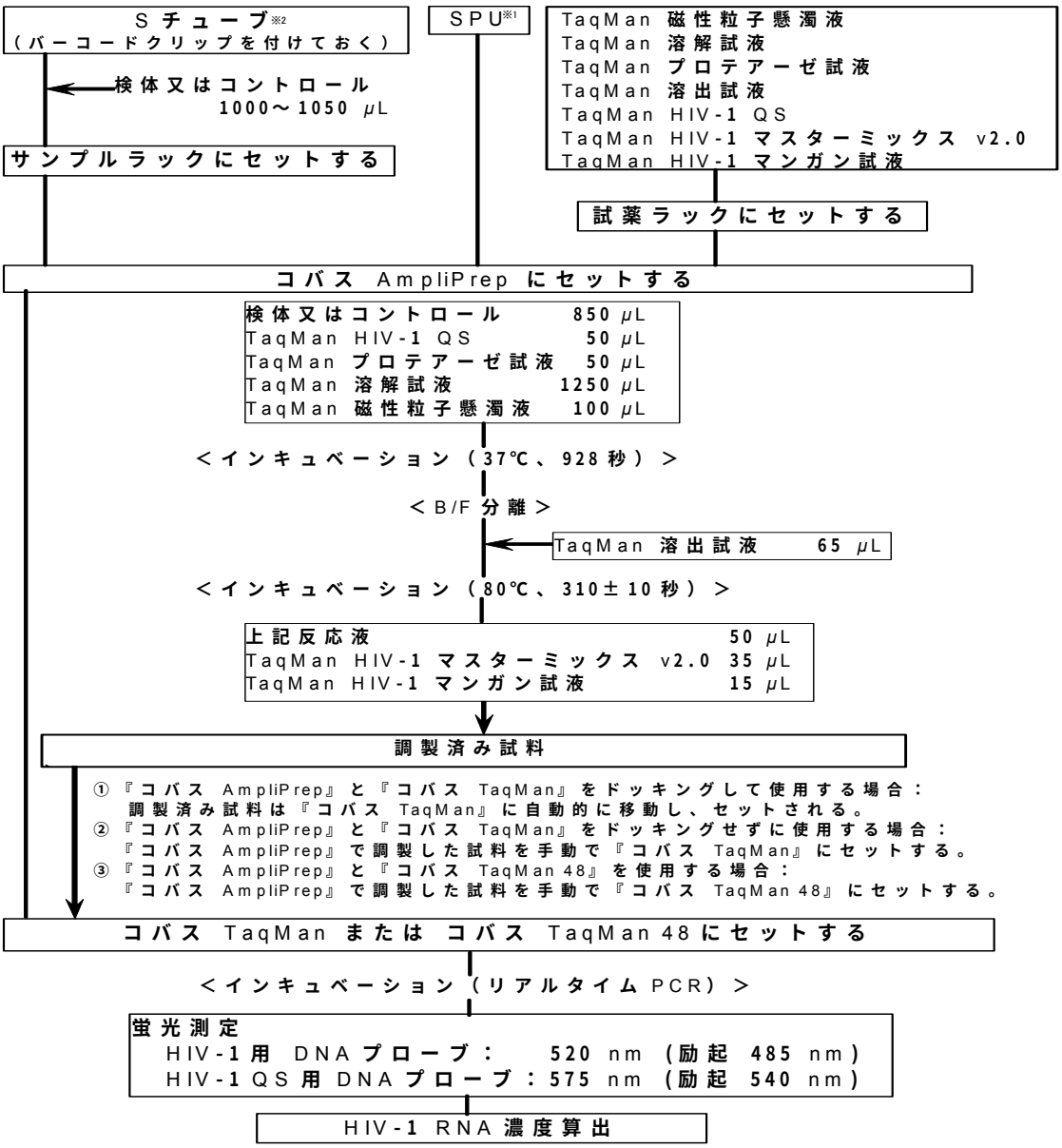
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
フリーダイヤル: 0120-600-152

**《特許に関連するお知らせ》

本製品をご購入頂きましたお客様は、これら製品をヒトの体外診断目的における PCR による核酸配列の増幅と検出、及びその関連工程に使用することが許諾されています。この特定された使用許諾権以外には、いかなる種類の特許権又はライセンスも許諾されているものではありません。

COBAS and TaqMan are trademarks of Roche.
コバス及び TaqMan は Roche の商標です。

《操作概略》



サンプル処理ユニット【SPU】(CAP)※1：Sample Processing Units、検体又はコントロールと各試薬の混合など、試料の調製に用いる反応カップ。
S チューブ（CAP）（バーコードクリップ付）※2：検体又はコントロールをこれに分注する。